

상산의 NF-κB 활성억제작용과 IKK γ 의 연관성 연구

최병태¹ · 이용태² · 황장선 · 문혜인 · 이경수 · 안원근³ · 김동완*

창원대학교 자연과학대학 미생물학과, 1: 동의대학교 한의과대학 해부학교실, 2: 생리학교실,
3: 부산대학교 나노과학기술대학 나노메디컬 공학과

Relationship of Inhibitory Effects of *Dichroa febrifuga* and IKK γ on the Activation of NF-κB

Byung Tae Choi¹, Yong Tae Lee², Jang Sun Hwang, Hae In Moon, Kyung Soo Lee,
Won Gun An³, Dong Wan Kim*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Changwon National University, 1: Department of Anatomy,

2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongeui University,

3: Department of Nanomedical engineering, College of Nanobiotechnology, Pusan National University

Activation of NF-κB is known to be a trigger of various cellular disorders including inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. Numerous approaches are ongoing within laboratories to identify potential therapeutic agents which inhibit the NF-κB activation. In this study, we have tested the inhibitory effects of five traditional medicines on the activation of NF-κB by NIK. Among three medicines which exhibited inhibitory effect on the expression of NF-κB reporter plasmid, we investigated further the inhibitory mechanism of *Dichroa febrifuga* in connection with IKK γ activity. Wild type IKK γ inhibited the NF-κB activation by NIK but the C-terminal deletion mutant of IKK γ did not show the inhibitory effect, indicating that the C-terminal leucine zipper domain of IKK γ is important for the inhibition of NF-κB activation. The water extract of *Dichroa febrifuga*(DFE) also strongly inhibited the NF-κB activation by NIK. The inhibitory activity of DFE appeared to be independent of the expression of IKK γ , suggesting that the pathways of inhibition by *Dichroa febrifuga* and IKK γ are different. Our results suggest that *Dichroa febrifuga* can be used as a medicine for inhibition of the NF-κB activation in a wide range of cells without relation to the expression of IKK γ .

Key words : *Dichroa febrifuga*, NF-κB activation, IKK γ , NIK

서 론

NF-κB는 세포에 가해지는 다양한 stress에 대한 방어작용과 면역세포의 활성화뿐만 아니라 세포의 사멸과 증식, 분화와 암화 등 세포에서 일어나는 변화에 매우 광범위하게 관여하고 있다는 사실이 밝혀지면서 NF-κB활성의 적절한 조절이 각종 질병의 치료에 효율적으로 이용될 수 있다는 기대와 함께 많은 연구가 이루어지고 있다^{1,2)}. 전사조절인자의 활성을 나타내는 NF-κB는 inhibitor인 IκB protein에 결합되어 세포질에 머물러 있다가 세포가 TNF-α, IL-1β, bacterial lipopolysaccharide, 활성산소, 방사

* 교신저자 : 김동완, 경남 창원시 사립동 9, 창원대학교 자연과학대학

· E-mail : dwkim@changwon.ac.kr, · Tel : 055-279-7462

· 접수 : 2006/04/19 · 수정 : 2006/05/19 · 채택 : 2006/05/28

선 등에 의해 자극을 받게 되면 세포내의 IKK complex가 활성화되고 IKK complex에 의해 IκB가 인산화 된 후 파괴됨에 따라 NF-κB가 세포의 핵 속으로 이동하게 된다^{3,4)}. 핵 내로 이동한 NF-κB는 염증유발과 자가면역질환 유발, 세포의 증식 및 사멸에 관련된 다양한 유전자의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있으며 실제로 많은 항염증제와 항암제가 NF-κB의 활성을 억제함으로써 약효를 나타내는 것으로 알려져 있다^{5,6)}. 한편 IKK γ 는 IKK α , IKK β 와 함께 NF-κB의 활성화 경로에서 중추적인 역할을 하는 IKK complex의 구성성분이다^{7,8)}. IKK γ 는 효소활성이 없는 phosphoprotein이며 2개의 coiled-coil domain과 C-말단에 1개의 Leucine zipper domain을 가지고 있으며 N-말단에는 IKK β 와의 결합부위를 가지고 있다^{9,10)}. IKK γ 가 결핍된 세포에서는 IKK의 고분자복합체가 형성되지 않으며 TNF-α, HIV의 Tax,

lipopolysaccharide 등에 의한 NF-κB활성화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있어 IKK γ 는 세포가 다양한 자극에 반응하여 NF-κB가 활성화 되는 과정에서 중요한 중계역할 및 조절작용을 하는 것으로 생각되고 있다^{11,12)}. 또한 IKK γ 는 세포외부의 환경적조건과 세포의 종류에 따라서 NF-κB활성을 억제할 수도 있다는 보고도 있어 NF-κB의 활성억제에 있어서 IKK γ 의 역할규명이 관심을 모으고 있다⁹⁾. 한편 최근에는 자연계에서 분리된 천연물이나 한약추출물이 염증에 의한 류마티스 관절염에 효능을 나타내고 있다는 보고와 함께 이들이 NF-κB의 활성억제작용을 하는 경우도 발견되어 한약재로부터 NF-κB의 활성억제물질탐색이 주목을 받고 있다¹³⁾. 본 연구에서는 NF-κB의 결합부위를 가지는 reporter plasmid를 이용하여 다섯 종류의 한약재 물추출물이 NF-κB의 활성에 미치는 영향을 검토하여 NF-κB의 활성억제작용을 가지는 한약재를 선발하였으며, 그 중에서 비교적 강한 NF-κB의 활성억제 작용을 가지는 상산(常山, *Dichroa febrifuga*)의 작용기전과 IKK γ 와의 연관성을 연구하였다. 상산(常山)은 학질치료작용이 있어 예로부터 학질치료 전문약으로 이용 되었으며 민간에서는 류마티스와 설사에 사용하기도 하고 물로 우려서 습성습진에 바르기도 한 한약재이다^{14,15)}. 한편 IKK γ 는 NF-κB활성조절 과정의 중요한 인자로 작용하며 IKK γ 자체가 조건에 따라서는 NF-κB의 활성억제작용도 하므로 상산(常山)의 억제작용과 IKK γ 와의 연관성을 검토함으로써 상산(常山)의 NF-κB활성억제 효과를 상승 시킬 수 있는 방안을 모색하였다.

재료 및 방법

1. 한약재의 물추출시료의 제조

각 한약재 100g을 분쇄한 후 증류수 500ml를 첨가하여 2시간동안 가열하였다. 가열한 시료는 3M 여과지에서 여과한 후 3,000rpm 으로 20분간 원심분리하여 상동액을 수거하였으며 3M 여과지와 pore size 0.45μm의 membrane filter로 여과한 후 동결건조 하였다. 동결건조 된 분말은 멀균된 증류수에 용해하여 실험에 사용하였다.

2. 세포배양 및 transfection

African green monkey kidney cell에 SV40의 T항원이 항시 발현되고 있는 cos-7세포를 실험에 이용하였으며 세포의 배양은 FBS가 10% 함유된 DMEM을 배지로 사용하여 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다. DNA를 도입하기위한 transfection은 fugene 6 (Roche Molecular Biochemicals)를 사용하였으며 fugene 6와 혈청을 함유하지 않은 DMEM의 혼합액에 도입할 DNA를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 subconfluent (약 70~80% confluent) 상태의 세포에 투여하였다.

3. CAT assay

시료세포의 배지를 제거하고 냉각한 PBS로 2회 세척한 후 rubber policeman으로 scrape하여 세포를 수거하였다. 수거한 세

포는 0.25M Tris-HCl(pH7.8) 200μl에 혼탁한 다음 dry ice를 이용하여 6회의 freezing-thawing 으로 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액은 4°C, 1,500rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수거하여 CAT assay를 위한 세포추출물로 이용하였다. CAT의 반응은 세포추출물을 Bradford 방법으로 단백질을 정량하여 동일한 단백질양을 활용하는 각 세포추출물에 [¹⁴C]-chloramphenicol (54mCi/mmol) 6μl, 4mM acetyl CoA 60μl, 및 Tris-HCl(pH7.8)을 첨가하여 총 238μl의 반응액으로 37°C에서 3시간 반응시켰다. 반응생성물은 1ml의 ethylacetate로써 추출한 다음 speed vacuum dryer로써 농축시킨 후 TLC plate에 점적하고 chloroform : methanol (95:5)의 용매를 이용하여 전개시켰다. 전개한 TLC plate는 autoradiography를 하여 결과를 관찰하였으며 GS-700 Imaging Densitometer(Bio-Rad)를 이용하여 density분석을 하였다.

4. Western blotting

시료단백질을 10%의 polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 Hybond ECL membrane (Amersham)에 electrotransfer(63V, 10시간)하고 membrane을 5% 탈지분유로 blocking하였다. membrane은 IKK γ 에 대한 mouse의 monoclonal antibody와 함께 실온에서 1시간 동안 반응시키고 TBS-T용액으로 3번 세척한 후 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 항체와 함께 다시 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 TBS-T용액으로 3회 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL)로 발광시켜 분석하였다.

결과 및 고찰

1. NF-κB의 활성화에 미치는 각종 한약재의 영향

NF-κB는 활성화 되었을 때 핵 내로 이동하여 NF-κB의 결합부위를 가진 DNA에 특이적으로 결합하며 결합부위주변의 유전자 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 본 연구에서는 이러한 NF-κB의 활성화를 관찰하기 위하여 herpes simplex virus의 thymidine kinase promoter에 NF-κB결합부위 4개를 결합시키고 그 뒤에 reporter gene으로서 bacteria의 cat 유전자를 연결시킨 pNF-κB-CAT plasmid를 reporter plasmid로 이용하였다(Fig. 1A). 또한 NF-κB의 활성화과정의 초기에 작용하는 NIK(NF-κB inducing kinase)의 발현 plasmid(pcmv-NIK)를 pNF-κB-CAT plasmid와 함께 세포내에 co-transfection하여 NF-κB의 활성화상태를 만들었다. 한약재가 NF-κB 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위해 다섯 종류의 한약재를 선정하여 실험하였다(Table 1). cos 세포에 pNF-κB-CAT plasmid와 NIK발현 plasmid를 co-transfection하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 Table 1의 각 한약재를 800 μg/ml되게 투여하였다. 한약재가 투여된 세포는 20시간 동안 더 배양한 뒤 세포를 수거하여 CAT assay를 실시하였다. 그 결과 현삼, 상산, 질경은 NF-κB의 활성화를 강하게 억제하는 것으로 나타났으며 생지황과 우슬은 NF-κB의 활성화를 억제하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 이결과로 부터 사용한 한약재중에서 NF-κB의 활성화를 가장 강력하게 억

제하는 것으로 나타난 상산(*Dichroa febrifuga*)을 대상으로 NF-κB의 활성억제작용과 IKK γ 와의 연관성을 연구하였다.

Table 1. List of traditional medicines used in the test of inhibitory effect on NF-κB activation.

No.	Korean herbal name	Scientific name
1	한삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>
2	상산	<i>Dichroa febrifuga</i>
3	길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>
4	생지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>
5	우슬	<i>Achyranthes japonica</i>

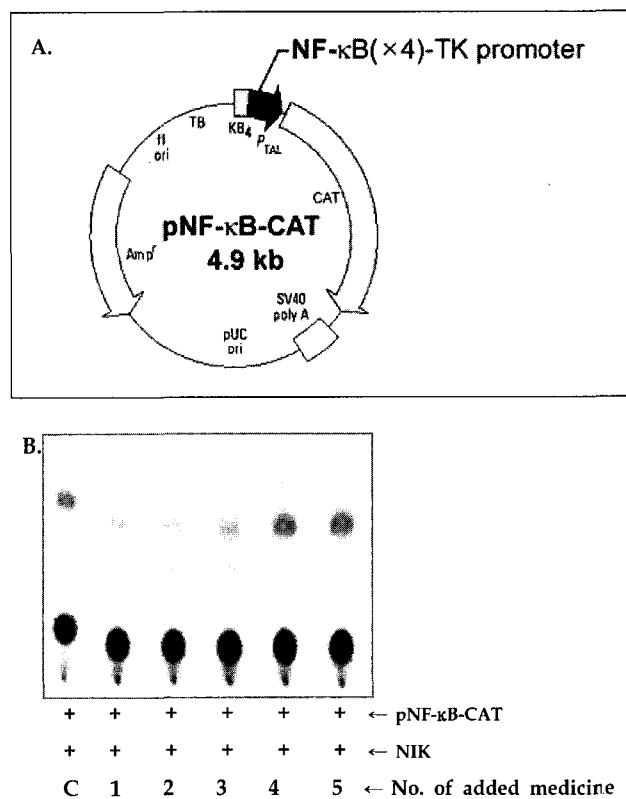


Fig. 1. (A) Structure of pNF-κB-CAT plasmid. pNF-κB-CAT contains four tandem copies of the NF-κB consensus sequence fused to a TATA-like promoter (PTAL) region from the Herpes simplex virus thymidine kinase(TK)promoter. (B) Inhibitory effect of medicinal materials on the NF-κB activation by NIK. Cos cells were transfected with pNF-κB-CAT reporter plasmid and NIK expression plasmid and after 24hr, each medicinal material (800 μ g/ml) was added to the transfected cells. After incubation for 20hr, the cells were harvested and assayed for CAT activity. The No. of added medicine is identical to the No. in table 1. C, not-added control.

2. IKK γ 의 over expression이 NF-κB의 활성화에 미치는 영향

IKK complex의 구성성분인 IKK γ 는 kinase 활성을 가지지 않으나 IKK complex가 고분자 복합체를 형성하는데 필요하며 NF-κB를 활성화시키는 다양한 자극을 IKK complex에 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 그러므로 세포로부터 IKK γ 를 완전히 제거하면 NF-κB의 활성화가 일어나지 않으며 세포에 치명적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 세포내의 대부분의 IKK γ 는 IKK complex에 결합되어 있으나 IKK γ 를 over expression시켰을 경우에는 IKK complex에 결합되지 않는 IKK γ 가 세포내에 존재하게 된다. 지금까지 IKK γ 를 세포로부터 제거

한 후 발생되는 세포내의 변화에 대해서는 많은 연구결과가 보고되었으나 IKK γ 를 over expression시켰을 때 나타나는 변화에 대한 보고는 거의 없는 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 IKK γ 의 over expression이 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 wild type의 IKK γ 와 c-말단의 100아미노산을 제거하여 leucine zipper motif 부분이 결손된 IKK γ 의 deletion mutant (Δ C)를 발현하는 plasmid를 제작하였다(Fig. 2A). 이 발현 plasmid들을 cos 세포에 transfection하여 IKK γ 의 expression을 관찰한 결과 IKK γ 의 N-말단을 인식하는 항체를 이용한 Western blotting에서는 예상한 크기의 IKK γ 단백질이 검출되었고(Fig. 2B, upper), C-말단을 인식하는 항체에서는 Δ C mutant에서 band가 나타나지 않았으므로(Fig. 2B, lower) IKK γ 의 wild type과 Δ C mutant가 의도한대로 발현됨을 확인할 수 있었다¹⁶⁾.

다음은 IKK γ 의 over expression이 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위해 cos세포에 pNF-κB-CAT plasmid, NIK 발현 plasmid 및 IKK γ 의 wild type 또는 Δ C mutant의 발현 plasmid를 다양한 조합으로 co-transfection하여 CAT assay를 실시하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 NIK발현 plasmid의 첨가에 의해 NF-κB의 활성이 약 2배 증가하여 NF-κB의 활성화가 유도되었음을 알 수 있었고 이러한 NIK에 의한 NF-κB의 활성화는 wild type IKK γ 의 over expression에 의해 현저히 억제되는 것으로 나타났다. wild type IKK γ 의 발현 후의 NF-κB의 활성이 NIK에 의해 활성화되기 전보다 낮게 나타났으므로 wild type IKK γ 는 활성화되지 않은 basal level의 NF-κB활성도 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A, B). 그러나 이러한 IKK γ 의 NF-κB활성억제 효과는 C-말단이 결손된 Δ C IKK γ 에서는 나타나지 않았다(Fig. 3A, B). 이로부터 IKK γ 의 NF-κB활성억제 작용에는 C-말단의 leucine zipper domain이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

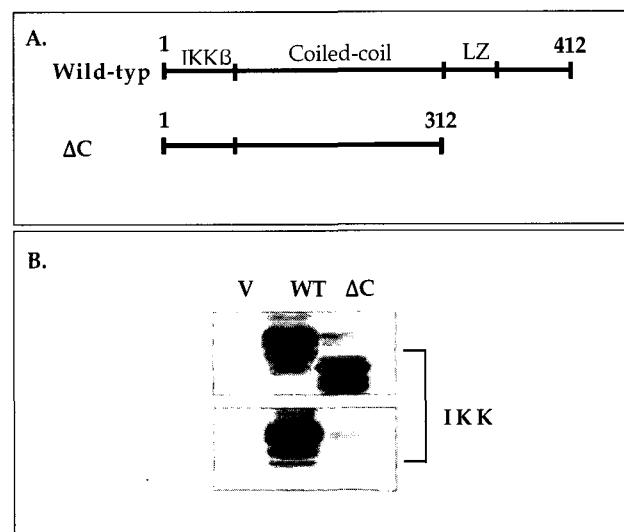


Fig. 2. Schematic illustration of domains included in the expression plasmids for the wild-type(WT) and Δ C IKK γ proteins. (A) The N-terminal IKK β binding domain, coiled-coil domain and leucine zipper domain(LZ) are shown. (B) Cytoplasmic extracts of cos cells transfected with pcmy5 empty vector(V) or each IKK γ expression plasmid were electrophoresed and analyzed by Western blotting using monoclonal antibodies against the N-terminal(upper) or C-terminal(lower) region of IKK γ .

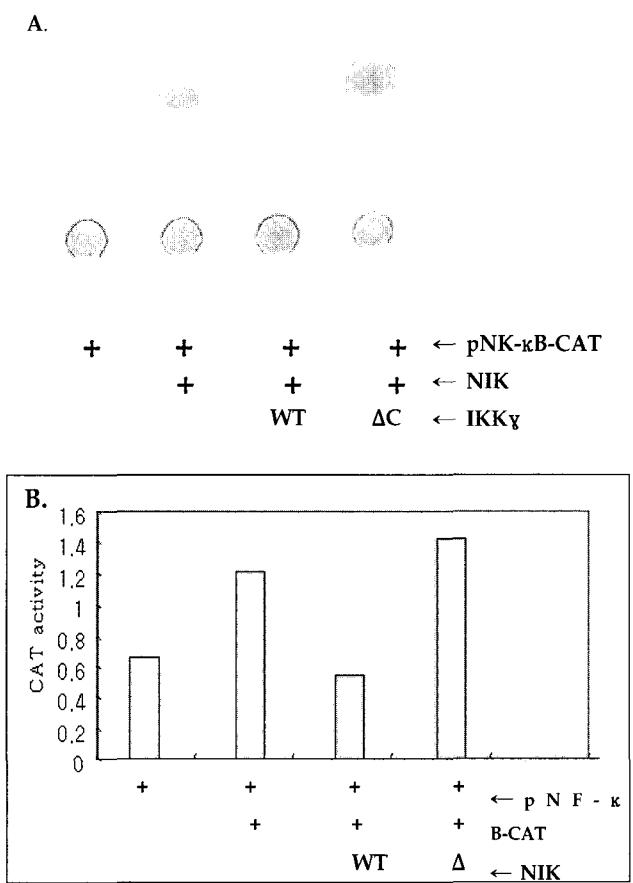


Fig. 3. Effect of IKK γ on the activation of NF- κ B by NIK. The plasmid pNF- κ B-CAT was co-transfected into cos cells with the NIK expression plasmid and the expression plasmid for wild type(WT) or C-terminal deletion mutant(Δ C) of IKK γ as indicated. After 48hr of transfection, the cells were harvested and assayed for CAT activity(A), and results were analyzed on the Imaging Densitometer GS-700(Bio-Rad)(B).

3. 세포증식에 미치는 상산(常山)의 영향

Fig. 1B에서 상산(常山)을 800 μ g/ml의 농도로 투여했을 때 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화가 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 억제작용이 상산(常山)의 세포독성에 의한 세포증식 억제로 인해 나타났을 가능성이 있으므로 상산(常山)이 cos 세포의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. 상산(常山)의 물추출물을 400 μ g/ml, 800 μ g/ml, 1,200 μ g/ml의 농도로 cos 세포에 투여한 후 24시간 및 48시간동안 배양한 뒤 세포의 수를 산정하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 상산(常山)을 1,200 μ g/ml로 투여하였을 때는 세포증식이 억제되는 결과가 나왔으나 400 μ g/ml과 800 μ g/ml의 투여에서는 상산(常山)을 투여하지 않은 control과 비교하여 세포증식억제효과가 거의 나타나지 않았다. 이로부터 Fig.1B의 상산(常山) 물추출물 800 μ g/ml에서 나타난 NF- κ B활성억제효과는 세포독성에 의한 것이 아님을 알 수 있었다.

4. NF- κ B의 활성억제 작용에 있어서 상산(常山)과 IKK γ 의 연관성

상산(常山)을 800 μ g/ml로 처리하였을 때 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화가 현저하게 억제되었으며(Fig. 1B), wild type의 IKK γ 를 over expression 시켰을 때도 NF- κ B의 활성화가 억제되는 것

으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 상산(常山)과 IKK γ 의 NF- κ B 활성 억제 작용의 상호연관성을 검토하기 위해 cos세포에 pNF- κ B-CAT plasmid와 NIK 발현 plasmid 및 IKK γ 발현 plasmid를 co-transfection 하고 24시간 후에 상산(常山)을 800 μ g/ml의 농도로 투여하여 20시간 더 배양한 뒤 CAT assay를 실시하였다. 그 결과 Fig. 5A,C에 나타난 바와 같이 NF- κ B는 NIK의 발현에 의해 활성화 되었으며 이러한 활성화는 wild type의 IKK γ 에 의해 활성화되기전의 수준으로 억제되었고 IKK γ 의 Δ C mutant에서는 활성억제작용이 나타나지 않았으므로 Fig. 3의 결과와 일치하였다. 또한 IKK γ 의 wild type과 Δ C mutant가 정상적으로 발현되었음이 Western blotting에 의해 확인되었다(Fig. 5B). 그런데 IKK γ 의 Δ C mutant에서는 오히려 NF- κ B의 활성을 증가하는 효과가 나타났는데 이는 Δ C mutant가 wild type IKK γ 에 대하여 dominant negative로 작용한 결과일 것으로 추정된다(Fig. 3, Fig. 5). 한편 상산(常山)에 의한 NF- κ B의 활성억제효과는 wild type 및 Δ C IKK γ 의 발현과 상관없이 억제작용이 나타났다(Fig. 5A, C). 특히 NF- κ B의 활성억제효과가 없는 Δ C IKK γ 의 over expression 상태에서도 상산(常山)은 억제효과를 나타내었으므로 상산(常山)의 NF- κ B 활성억제효과가 IKK γ 의 영향을 받지 않으며, IKK γ 와 다른 경로를 통하여 NF- κ B의 활성을 억제할 가능성을 나타내었다. IKK γ 는 IKK complex에서 NF- κ B의 활성을 조절하는 역할을 하고 있으며 NF- κ B의 활성화가 IKK γ 를 경유하여 일어나는 경우가 많은 것으로 알려져 있으나^{11,12)} Fig. 5의 결과로 미루어 볼 때 상산(常山)의 활성억제효과는 IKK γ 와 상관없이 일어날 가능성이 높다고 볼 수 있다.

또한 Fig. 5에서 상산(常山)은 NIK에 의해서 활성화되지 않은 basal level의 NF- κ B의 활성도 억제하는 것으로 나타났다. 이는 NF- κ B의 활성화 인자에 의해 자극을 받지 않은 세포에도 상산(常山)을 NF- κ B의 활성억제제로 사용할 수 있음을 의미하며 상산(常山)은 NF- κ B의 활성화 원인에 상관없이 광범위한 NF- κ B 활성억제제로 사용 가능함을 시사한다. 더구나 상산(常山)은 IKK γ 와 상관없이 NF- κ B를 억제하므로 IKK γ 의 활성이 비정상적으로 낮거나 IKK γ 에 변이가 생겨 IKK γ 의 정상기능이 약화된 세포에도 상산(常山)을 NF- κ B의 저해제로 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

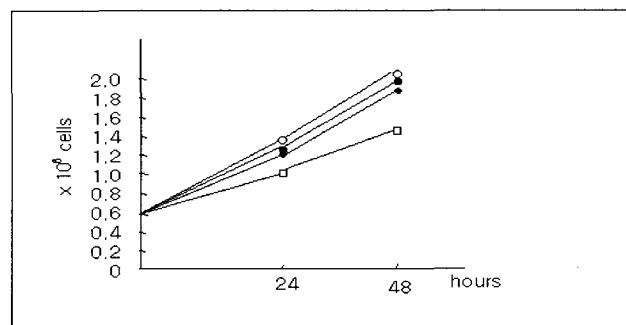


Fig. 4 Effect DFE on the growth of cos cells. Water extract of Dichroa febrifuga(DFE) was added to the cos cells at various concentrations and the cell growth was estimated by cell counting with hemocytometer. ●: not-added control, ○: 400 μ g/ml, ◆: 800 μ g/ml, □: 1,200 μ g/ml

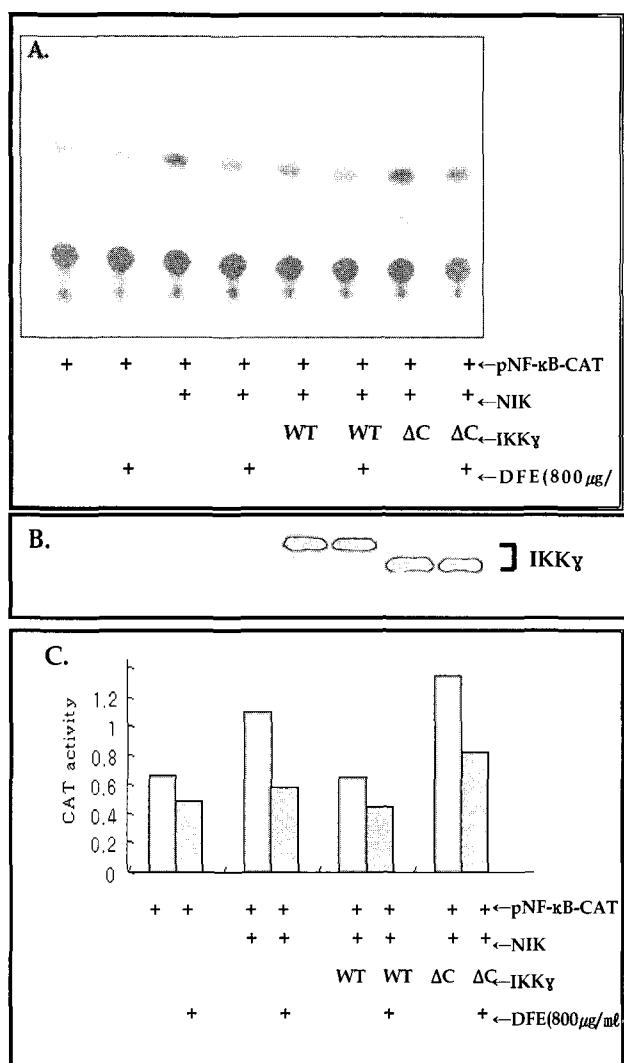


Fig. 5 Inhibitory effects of IKK γ and DFE on the activation of NF- κ B by NIK. Cos cells were co-transfected with the plasmid pNF- κ B-CAT, NIK expression plasmid and wild type or mutant(Δ) IKK γ expression plasmid as indicated, and after 24hr, the cells were treated with DFE(800 μ g/ml) for 20hr and assayed for CAT activity(A). The expression of IKK γ was detected by Western blotting with monoclonal antibody against N-terminal of IKK γ (B). The result of CAT assay was analyzed on the Imaging Densitometer GS-700(Bio-Rad)(C).

결론

본 연구는 NF-κB의 reporter plasmid를 이용하여 NF-κB의 활성을 억제하는 한약재를 탐색하였으며 그 결과 상산(常山, *Dichroa febrifuga*)이 강력한 NF-κB활성억제 작용을 가짐을 알 수 있었다. 상산(常山)의 NF-κB 활성억제 효과를 IKK complex의 구성성분인 IKK γ 의 작용과 관련지어 연구한 결과 상산(常山)의 투여와 IKK γ 의 over expression은 모두 NF-κB의 활성을 억제하였고 그 작용은 서로 독립적인 경로를 통하여 일어날 가능성이 높으며, 상산(常山)은 IKK γ 를 경유하지 않고 NF-κB의 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 상산(常山)이 NF-κB 활성화의 원인과 상관없이 광범위한 NF-κB의 활성 억제제로 사용될 수 있음을 의미하며 wild type IKK γ 의 over expression도 NF-κB의 활

성을 억제하였으므로 IKK γ 의 활성이 높은 세포에 상산(常山)을 투여하면 NF-κB의 활성억제효과가 더욱 상승되며, IKK γ 의 활성이 낮거나 유전자변이로 인해 IKK γ 의 기능이 손실된 세포에서도 상산(常山)은 NF-κB의 활성을 억제할 수 있으므로 상산(常山)은 광범위한 세포에서 NF-κB의 활성억제제로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2003년 한국학술진흥재단 중점 연구소지원사업과 2005년도 창원대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어짐.

참고문헌

1. Adcock, I.M., Chung, K.F., Caramori, G., Ito, K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur. J. Pharmacology* 533:118-132, 2006.
 2. Wang, W., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Larry, L., Cleary, K.R., Chiao, P.J. The nuclear factor- κ B transcriptional factor is constitutively active in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 5:119-127, 1999.
 3. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Mariatis, T. Signal-induced site specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin proteosome pathway. *Genes Dev.* 9:1586-1597, 1995.
 4. DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., Karin, M. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16:1295-1304, 1996.
 5. Dejardin, E., Deregowki, V., Chapelier, M., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M., Bours, V. Regulation of NF- κ B activation by I κ B related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 18:2567-2577, 1999.
 6. Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Anderson, K.C. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277:16639-16647, 2002.
 7. Yamamoto, Y., Kim, D.W., Kwak, Y.T., Prajapati, S., Verma, U., Gaynor, R.B. IKK γ /NEMO facilitates the recruitment of the I κ B protein into the I κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 276:36327-36336, 2001.
 8. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*. 395:297-300, 1998.
 9. Kwon, W.J., Kim, S.H., Park, Y.O., Cho, M., Kang, C.D., Lee, G., An, W.G., Joo, W.H., Kim, D.W. IKK γ inhibits activation of NF- κ B by NIK. *Mol. Cell.* 18:200-206, 2004.
 10. Zang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., Wallach, D.

- Recruitment of IKK signalosome to the p55 TNF receptor : RIP and A20 bind to NEMO(IKK gamma) upon receptor stimulation. *Immunity.* 12:301-311, 2000.
11. Bonif, M., Meuwis, M.A., Close, P. et al. TNF α and IKK β mediated TANK/I-TRAF phosphorylation : implications for interaction with NEMO/IKK γ and NF- κ B activation. *Biochem. J.* 394:593-603, 2006.
12. Yamaok, S., Courtois, G., Bessia, C. et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the IKappa B kinase complex essential for NF-kappa B activation. *Cell.* 93:1231-1240, 1998.
13. Kim, S.J., Jeong, H.J., Moon, P.D. et al. Anti-inflammatory activity of Gumiganghwaltang through the inhibition of nuclear factor- κ B activation in peritoneal macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 29:233-237, 2005.
14. 허 준. 대역동의보감. 법인문화사. p 1787, 1999.
15. 황궁수. 본초구진. 광업서국인행. 북경, 1987.
16. May, M.J., Marienfeld, R.B., Ghosh, S. Characterization of the I κ B kinase NEMO binding domain. *J. Biol. Chem.* 277:45992-46000, 2002.